

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 11 月 25 日 (25.11.2004)

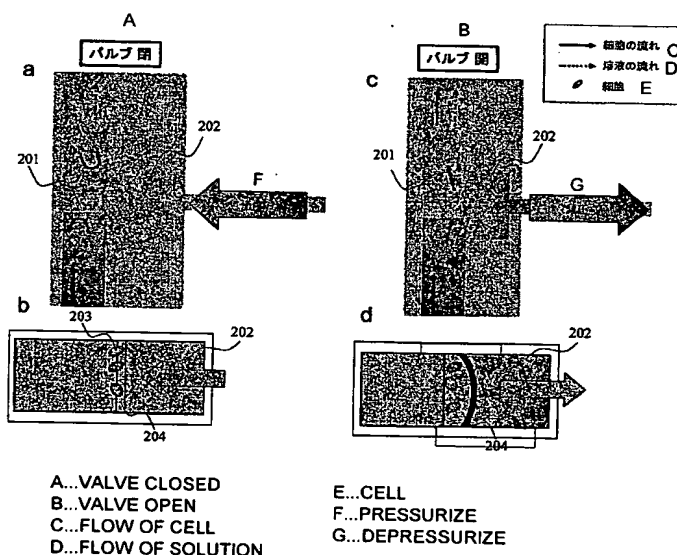
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/101734 A1

- (51) 国際特許分類: C12M 1/34 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006283 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安田 賢二 (YASUDA, Kenji) [JP/JP]; 〒1350052 東京都江東区潮見 2-8-14-1014 Tokyo (JP). 高橋 一憲 (TAKAHASHI, Kazunori) [JP/JP]; 〒1810004 東京都三鷹市新川 6 丁目 22-20 D-202 Tokyo (JP).
(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 30 日 (30.04.2004)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語 (74) 代理人: 下田 昭 (SHIMODA, Akira); 〒1040031 東京都中央区京橋 3-3-4 京橋日英ビル 4 階 Tokyo (JP).
(30) 優先権データ: 特願 2003-139773 2003 年 5 月 19 日 (19.05.2003) JP (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, [続葉有]

(54) Title: MICRO CHAMBER FOR CELL CULTURE

(54) 発明の名称: 細胞培養用マイクロチャンバー



(57) Abstract: A micro chamber capable of opening/closing a flow passage allowing the selective recovery of migration cells in the micro chamber by reversibly changing the shape of the micro chamber during culture. A cell culture area (110) optically transparent in visible area and formed in elastic macromolecules, flow passages (108, 109) positioned at both ends thereof, air reservoirs (105, 106) controlling the opened/closed states by expansion and contraction, air flow passages (103, 104) for pressurizing and depressurizing the air reservoirs, and connection joints (101, 102) to an air pressure control part are disposed on an optically transparent substrate (112) such as a slide glass. A culture solution containing cells is allowed to flow continuously in the direction of a flow (107).

(57) 要約: 培養中にマイクロチャンバーの形状を可逆に変化させることで、マイクロチャンバー内の泳動細胞を選択的に回収できる流路を開閉することのできる新しいマイクロチャンバーを提供する。スライドガラス等の光学的に透明な基板 112 上に、光学的に可視領域で透明で、かつ弾性高分子中に形成された細胞培

[続葉有]



NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

養領域110と、その両端に位置する流路108、109と、この開閉状況を膨張・収縮によって調節する空気溜105、106と、この空気溜へ加圧、減圧を行うための空気の流路103、104と、空気圧制御部との接続ジョイント101、102が配置されており、細胞を含む培養液は流れ107の方向に連続的に流れることができる。

明 細 書

細胞培養用マイクロチャンバー

5 技術分野

この発明は、細胞培養用のマイクロチャンバーに関し、より詳細には、細胞の状態を顕微鏡観察しながら1細胞単位で培養することのできる細胞培養用のマイクロチャンバーに関する。

10 従来技術

従来、細胞の状態の変化や、細胞の薬物等に対する応答を観察するのに、細胞集団の値の平均値をあたかも一細胞の特性であるかの様に観察してきた。しかし、実際には細胞は集団の中で細胞周期が同調しているものはまれであり、各々の細胞が異なった周期でタンパク質を発現している。

- 15 これらの問題を解決するべく、同調培養等の手法が開発されているが、培養された細胞の由来が全く同一の一細胞からではないことから、培養前の由来細胞各々の遺伝子の違いがタンパク質発現の違いを生み出す可能性があり、実際に刺激に対する応答の結果を解析するときに、そのゆらぎが細胞の反応機構自体が普遍的に持つ応答のゆらぎに由来するものなのか、細胞の違い（すなわち遺伝情報の違い）に由来するゆらぎなのか明らかにすることは難しかった。

また、同様の理由から、細胞株についても、一般には完全に一細胞から培養したものではないため、刺激に対する応答の再現性が細胞各々の遺伝子の違いによってゆらぐものか明らかにするのは難しかった。

- 25 更にまた、細胞に対する刺激（シグナル）は、細胞周辺の溶液に含まれるシグナル物質、栄養、溶存気体の量によって与えられるものと、他の細胞との物理的接触によるものの2種類があることから、ゆらぎについての判断が難しいのが実情であった。

一方、従来より、バイオテクノロジーの研究分野において細胞の観察を行う場合には、大型培養器にて培養された細胞群の一部を一時的に培養器から取り出し

て顕微鏡にセットし、観察を行うか、あるいは、顕微鏡全体をプラスチックの容器で囲い温度を管理し、その中に小さい別の容器を用い二酸化炭素濃度、及び湿度を管理しつつ、顕微鏡観察を行っていた。このとき、細胞を培養しながら、古くなった培養液と新鮮な培養液を交換することで溶液条件を一定にすることが工夫されてきている。

たとえば、循環ポンプを用いて、基材表面に対する培地のレベルを基材の上端縁高さより高いレベルと下端縁高さより低いレベルとの間で上げ・下げ操作することにより、上記低レベルに下がると培地を供給し、上記高レベルに上がると培地を排出する機構によって栄養状態を一定に保つことができる（特開平10-191961）。

また、培養容器内に、新たな培地を培養容器に導入する導入管と、培養容器の培地を外部に排出する排出管と、培養容器の気体部分とポンプとを連通する気管の各一端を挿入し、前記導入管、排出管及び気管の夫々の管路に培養容内への菌の侵入を阻止するフィルターを設けることにより、培養槽の栄養状態を一定に保つことができる（特開平8-172956）。

しかし、培養細胞の溶液環境と、細胞間の物理的接触を制御しながら培養することができなかった。

そこで、本発明者らは、これらの問題点を解決し、新たに特定の一細胞のみを選択し、その一細胞を細胞株として培養する技術、及び細胞を観察する場合に、細胞の溶液環境条件を制御し、かつ、容器中での細胞濃度を一定に制御する技術、あるいは相互作用する細胞を特定しながら培養観察する技術を出願した（特開2002-153260）。

発明が解決しようとする課題

しかし、上記文献（特開2002-153260）で用いた光ピンセット技術は、捕獲できる力の大きさがピコニュートン程度であり、これは浮遊する細胞を捕獲する力としては十分であるが、自ら泳動する細胞を捕獲するには不十分であった。また、培養中の泳動細胞を選択的に培養部から回収することは困難であった。

そこで、本発明者らは、上記のマイクロチャンバーについて更なる検討を加え、培養中にマイクロチャンバーの形状を可逆に変化させることで、マイクロチャンバー内の泳動細胞を選択的に回収できる流路を開閉することのできる新しいマイクロチャンバーを提供する。

5

課題を解決するための手段

即ち、本発明は、細胞培養領域、該領域と外部とを連結する少なくとも2つの流路、該流路の開閉手段、並びに該細胞培養領域及び流路の開閉を光学的に観察する手段から成る細胞培養用マイクロチャンバーであって、一の流路が細胞培養領域に細胞を含んでもよい培養液を注入することができる流路であり、他の一の流路が細胞培養領域から細胞を含んでもよい培養液を排出することができる流路であり、該流路の少なくとも一部が弾性材料により囲まれて成り、該開閉手段が該流路を外部から前記観察手段の観察方向に対してほぼ直角方向に押す又は引くことにより該流路を開閉又はその幅を変更するものであることを特徴とする細胞培養用マイクロチャンバーである。

15

この光学的観察手段として、光学的顕微鏡、ビデオ録画装置、カメラなどが挙げられ、これらはパソコン等に繋いで画像処理を行うものであってもよい。また、観察を容易にするため、光照射装置を共に用いてもよい。

この開閉手段を作動させていない時の、前記流路の幅が対象となる細胞サイズと同程度であることが好ましい。従って、適当な流路の幅は、対象となる細胞のサイズによって異なる。また、開閉手段を作動させていない時の、流路の幅を、対象となる細胞のサイズより若干狭くしておくと、細胞が通常状態ではこの流路を通過せず、流路を開けたときのみ通過するようになるため、細胞の分離に適する。

20

開閉手段は、流路に外部から力を加えて、流路を開閉又はその幅を変更させるものであればよい。機械的に力を加えるものや、空隙を設けてその体積を変化させるもの等いかなるものであってもよい。

25

また、前記開閉手段が前記流路に隣接する空隙を有し、該空隙が気体又は液体で満たされ、その圧を変更することにより、該空隙の大きさを変更し、その結果

該流路開閉又はその幅を変更するものであることが好ましい。この空隙を空気で満たし、この空隙を空気溜として、その空気圧で流路の開閉を制御することが最も簡便である。

5 流路は、その全部を弾性材料で囲まれるようにしてもよいし、その開閉手段側のみを弾性材料で作ってもよい。上記の空隙の周りとその流路の回りとを同じ材料で作し、その空隙の大きさの変化が直ちに流路の幅に影響するようにこれらを配置することが好ましい。

この弾性材料は、いかなる弾性材料であつてよく、細胞培養に悪影響の無い合成高分子を用いるのが簡便であり、特に、シリコーン系樹脂であることが好ましい。
10 い。

また、この細胞培養用マイクロチャンバーの細胞培養領域と流路の開閉を光学的に観察するため、必要な部分のみ透明材料で作ることが好ましい。全体を透明弾性材料で作ってもよい。

15 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の基本構成の一例を示す模式図である。

第2図は、流路の開閉プロセスの一例を説明した模式図である。

第3図は、培養マイクロチャンバー加工プロセスの一例を説明した顕微鏡写真を示す。

20 第4図は、培養マイクロチャンバー加工プロセスで用いた鋳型と高分子培養マイクロチャンバーの一例を説明した顕微鏡写真を示す。

第5図は、培養マイクロチャンバーの流路の開閉状態の例を示す顕微鏡写真を示す。

25 第6図は、培養マイクロチャンバーの流路が開状態で細胞が流路を通過する場合の顕微鏡写真を示す。矢印は細胞を示す。

図中の符号の説明

101、102 空気圧制御部との接続ジョイント

103、104 空気の通路

105、106、202 空気溜

- 107 溶液（細胞を含む培養液）の流れ
- 108、109、111、201、204 流路
- 110 細胞培養領域
- 112、302、304 ガラス基板
- 5 113、303 高分子（シリコーン系樹脂）
- 203 細胞
- 301 鋳型
- 305 空気圧調節部への接続コネクタ

10 発明の実施の形態

以下、本発明の細胞培養用マイクロチャンバーを詳細に説明するが、本発明の細胞培養用マイクロチャンバーはこれらに限定されるものではない。

まず、本発明の細胞培養マイクロチャンバーの基本構成の一例を第1図に示す。

- 第1図aの（B-B）水平断面図及び、第1図bの（A-A）縦断面図に例示す
- 15 ように、本発明の細胞培養マイクロチャンバー100は、スライドガラス等の光学的に透明な基板112上に、光学的に可視領域で透明かつ弾性の高分子中に形成された細胞培養領域110と、その両端に位置する流路108、109、111の開閉状況を膨張又は収縮によって調節する空気溜105、106と、この空気溜へ加圧又は減圧を行うための空気の通路103、104と、空気圧制御部と
- 20 の接続ジョイント101、102が配置されており、溶液（細胞を含む培養液）は流れ107の方向に連続的に流れることができる。

- 第1図に示すように、培養領域110は、2つの流路108、109の開放又は閉鎖状況によって、その中で培養している細胞を捕獲することも、排出することも可能である。ここで、流路の開閉は、空気溜の空気の圧力を制御することで、
- 25 流路を囲む高分子壁面を膨張又は収縮させ、流路111の幅を調節する。このとき、流路の幅を光学的計測手段によって計測できるよう、流路を、光学顕微鏡の光軸とは垂直な、水平面上に平面的に配置している。これによって、たとえば光学顕微鏡を用いることで、流路の幅、すなわち開放状況を実際に試料を流さなくても観察するだけで確認することができる。従って、この開放状況を目視で確認

しながら、空気溜 105、106 の空気圧を調整することが可能である。また、この開放状態を画像処理によって自動的に計測することによって、あらかじめ予定した開放状態にフィードバック制御することもできる。

次に、第2図を用いて、流路の開閉について説明する。第2図 a、b はそれぞれ、流路を適度に閉じて、溶液だけは流路 201 を通過するが、細胞 203 は通過させない状態での、水平断面と垂直断面図である。空気溜 202 に空気を導入して加圧することで、流路 204 は閉じ、その加圧の程度によって通過する細胞のサイズを調節することができる。

他方、第2図 c、d はそれぞれ、流路を開放して、溶液だけでなく細胞も流路 201 を通過する状態での、水平断面と垂直断面である。空気溜 202 から空気を排出することで、流路 204 は開き、その減圧の程度によって細胞をすべて通過させることができる。

第3図は、実際に細胞培養マイクロチャンバーを製作するプロセスの一例を示すものである。まず、フォトリソグラフ技術等の微細加工技術によって鋳型を形成する(第3図の1)。たとえば、光硬化性肉厚レジスト材、SU-8を用いることで、ガラス基板 302 上に光学的にSU-8を硬化させた鋳型 301 を作成することができる。次に、鋳型の上に、光学的に透明で、かつ、弾性高分子を流し込みに硬化させることで、鋳型の形状を高分子に転写することができる(第3図の2)。ここで、たとえば光学的に可視領域で透明でかつ弾力性を持つ素材としては、シリコーン樹脂(ポリジメチルシロキサン等)がある。高分子が硬化した後に、空気や溶液を流すための貫通穴を穿孔機を用いて作成し、鋳型から高分子をはがす(第3図の3)。最後に、この微細構造を転写した高分子をガラス基板 304 上に接着させ、空気圧調節部への接続コネクタや溶液の導入、排出部を取り付けることで細胞培養マイクロチャンバとして用いることができる。

第4図は、実際に第3図のプロセスで作成した光硬化性樹脂SU-8を用いて作成した細胞培養マイクロチャンバーの鋳型(第4図a)と、この鋳型を転写して作成した高分子微細構造(第4図b)の一例である。この光学顕微鏡写真から、鋳型の微細構造を正確に高分子に転写することができることがわかる。

第5図は、この細胞培養マイクロチャンバ中の流路の機能を示す一連の顕微鏡

写真である。第5図aでは、空気溜に空気を加圧することで、流路を閉じ、細胞も溶液も流れないようにしたところである。第5図bでは、空気溜を陰圧で吸引することで、流路を細胞が流れない程度に開放したところである。この顕微鏡写真からもわかるように、溶液の流れによって細胞は流路まで引き寄せられるが、
5 流路を通過することはできない。また、流路の開放量は光学顕微鏡によって目視で確認することができる。従って、細胞を実際に流さなくても、流路の開放値を目視のみで調節することができる。第5図cは、更に流路を開放することで、細胞を流したところである。

第6図には、更に実際に細胞が流路を通過する過程が顕微鏡写真で示されている。流路の左側にあった細胞（矢印）は（第6図の1）、流路を通過して（第6図の2）、流路の右側に通過する（第6図の3）。

発明の効果

本発明の細胞培養用マイクロチャンバーは以下のような特徴を持つ：

15 一細胞培養領域と外部とが流路によってのみ連結されるため、細胞が開閉装置などに接することがなく、細胞に余分な負荷がかからない。

一開閉手段が、流路の開閉の観察方向とほぼ直角であるため、観察が流路の開閉に影響されることが無く、また流路を通過又は通過しない細胞と、流路の開閉状態とを同時に観察することができる。

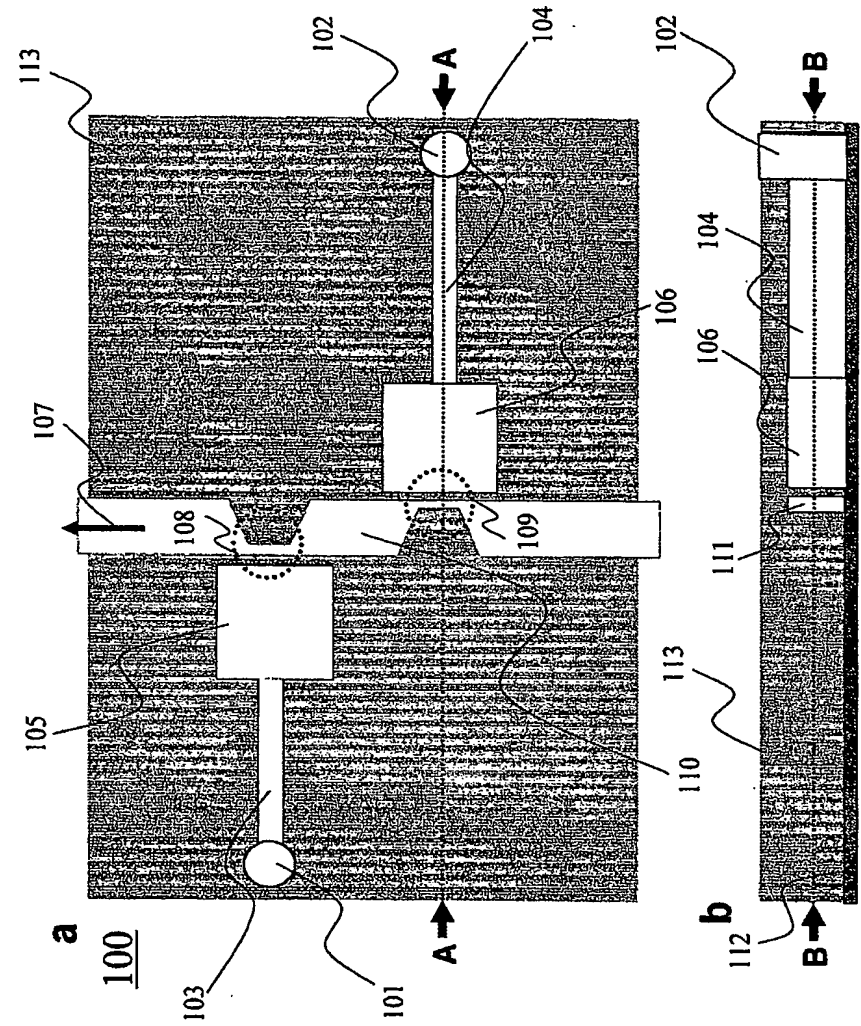
20 これらの特徴により、細胞の培養液から単一細胞を分離することが可能になる。

そのため、従来不可能であった、泳動する生物細胞等を容器内の細胞数を制御しながら培養することが可能となる。また、容器の内部の細胞を選択的に回収することが可能となる。

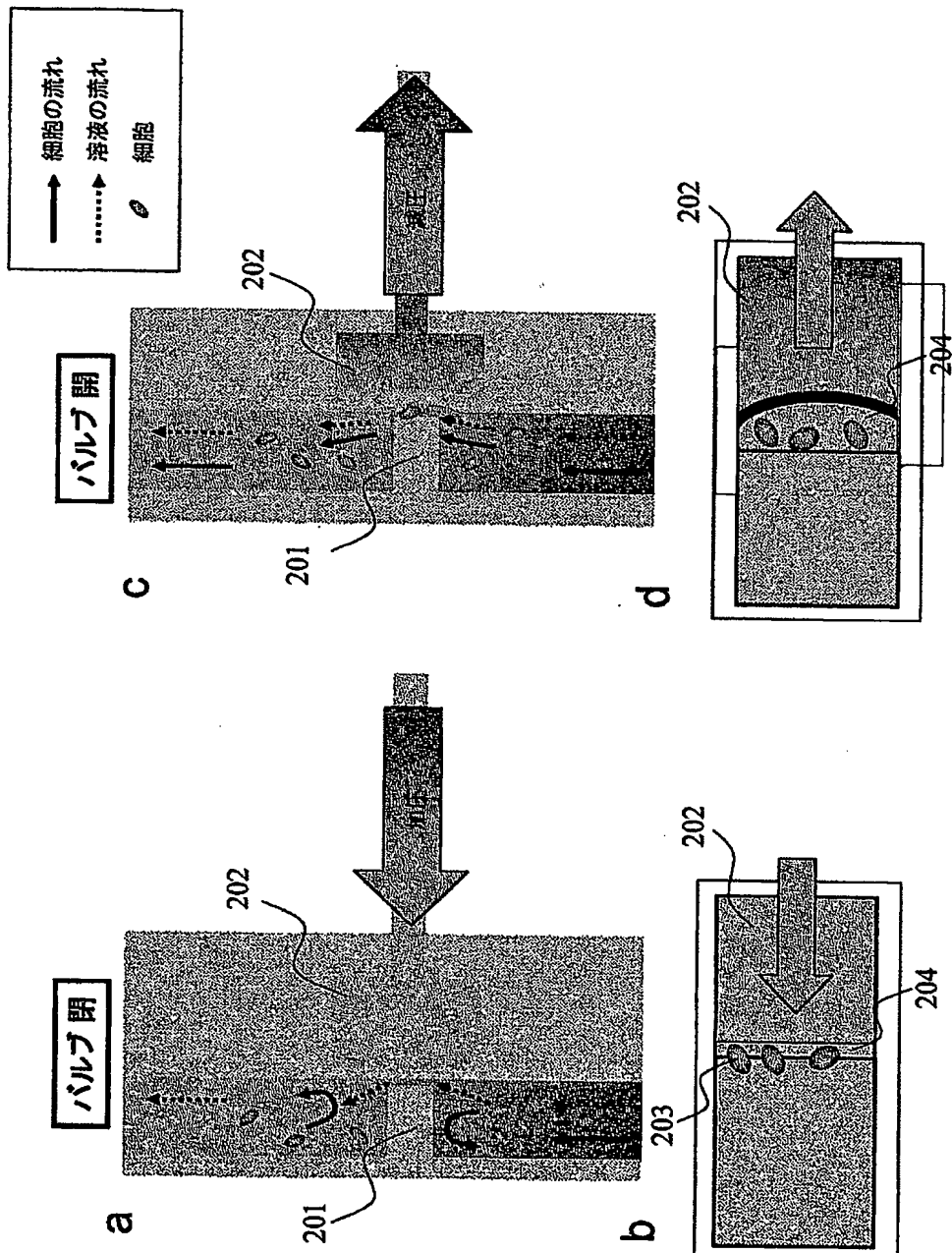
請 求 の 範 囲

1. 細胞培養領域、該領域と外部とを連結する少なくとも2つの流路、該流路の開閉手段、並びに該細胞培養領域及び流路の開閉を光学的に観察する手段から
5 成る細胞培養用マイクロチャンバーであって、一の流路が細胞培養領域に細胞を含んでもよい培養液を注入することができる流路であり、他の一の流路が細胞培養領域から細胞を含んでもよい培養液を排出することができる流路であり、該流路の少なくとも一部が弾性材料により囲まれて成り、該開閉手段が該流路を外部から前記観察手段の観察方向に対してほぼ直角方向に押す又は引くことにより該
10 流路を開閉又はその幅を変更するものであることを特徴とする細胞培養用マイクロチャンバー。
2. 前記開閉手段を作動させていない時の、前記流路の幅が対象となる細胞サイズと同程度である請求項1に記載の細胞培養用マイクロチャンバー。
3. 前記開閉手段が前記流路に隣接する空隙を有し、該空隙が気体又は液体で
15 満たされ、その圧を変更することにより、該空隙の大きさを変更し、その結果、該流路を開閉又はその幅を変更するものである請求項1又は2に記載の細胞培養用マイクロチャンバー。
4. 前記弾性材料がシリコーン系樹脂である請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞培養用マイクロチャンバー。

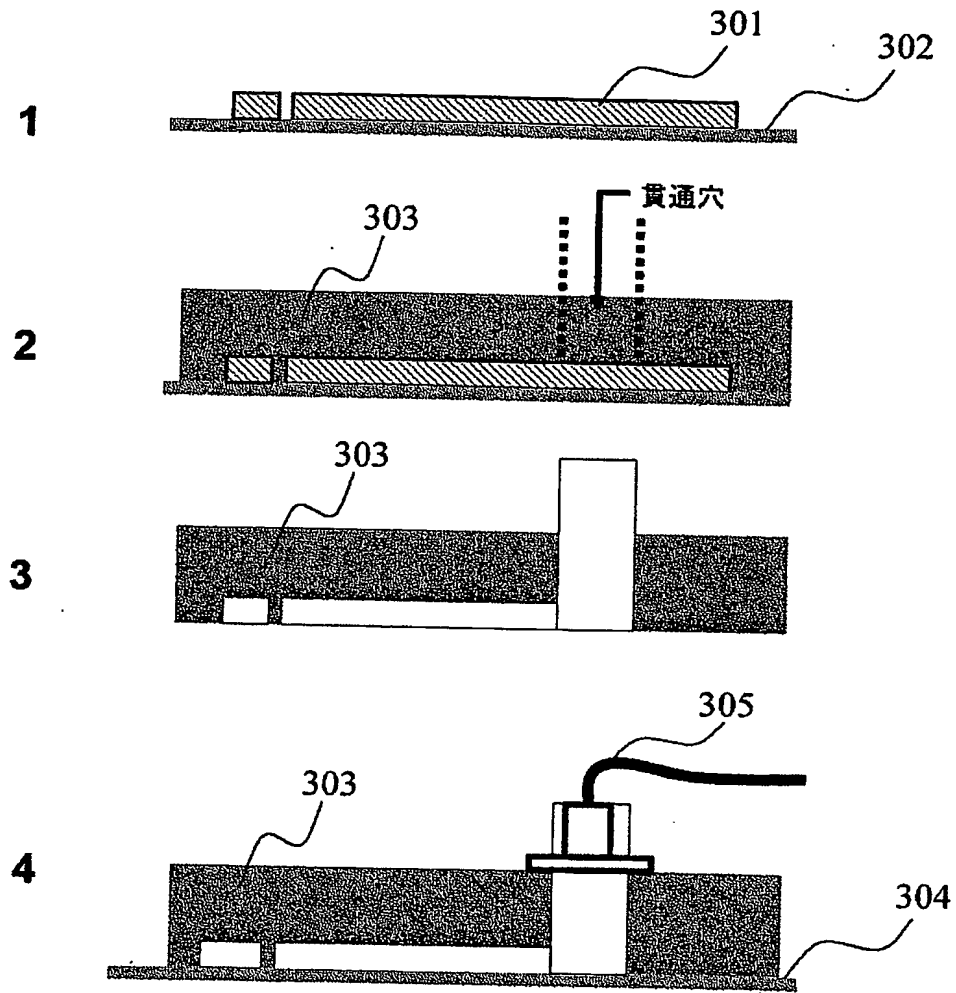
第 1 図



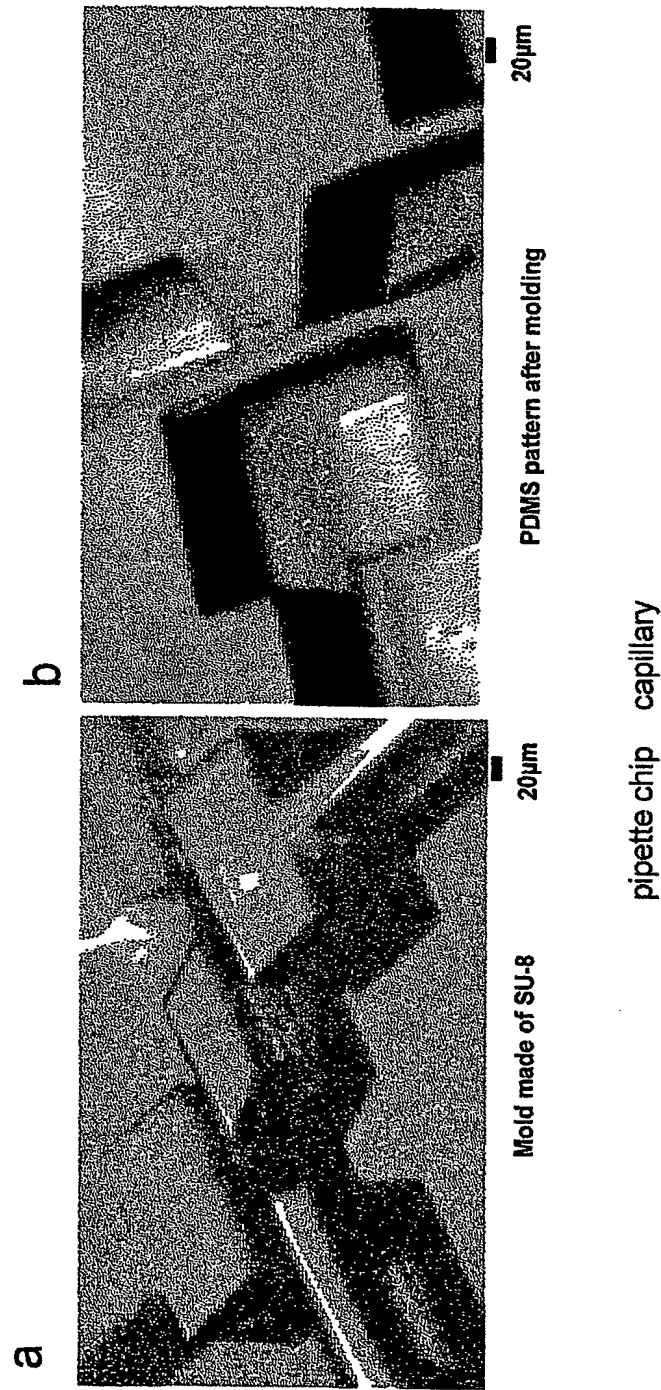
第 2 図



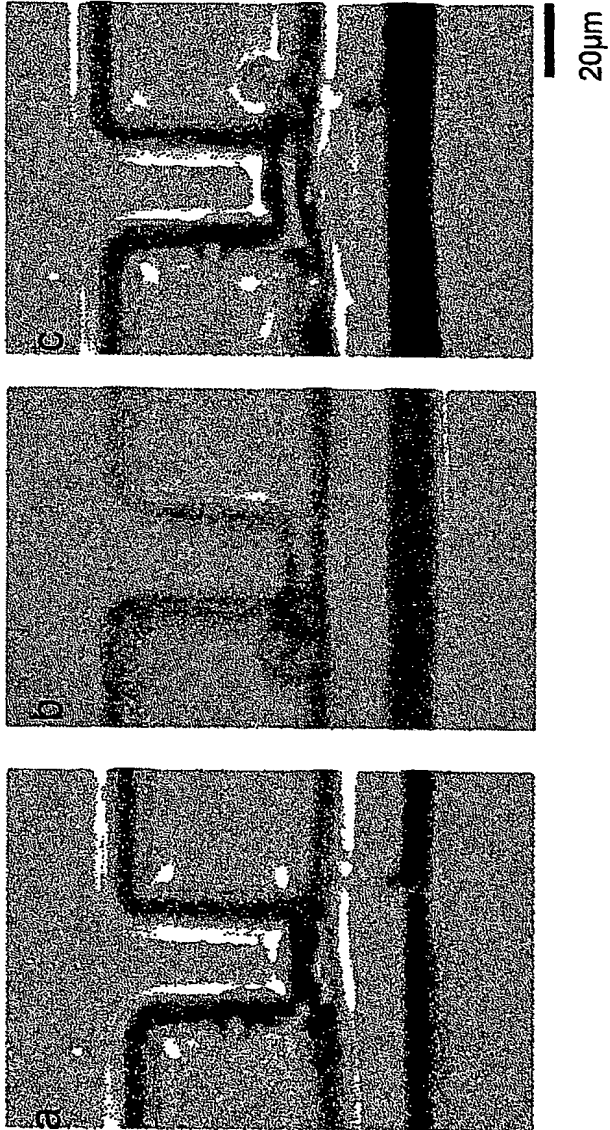
第 3 図



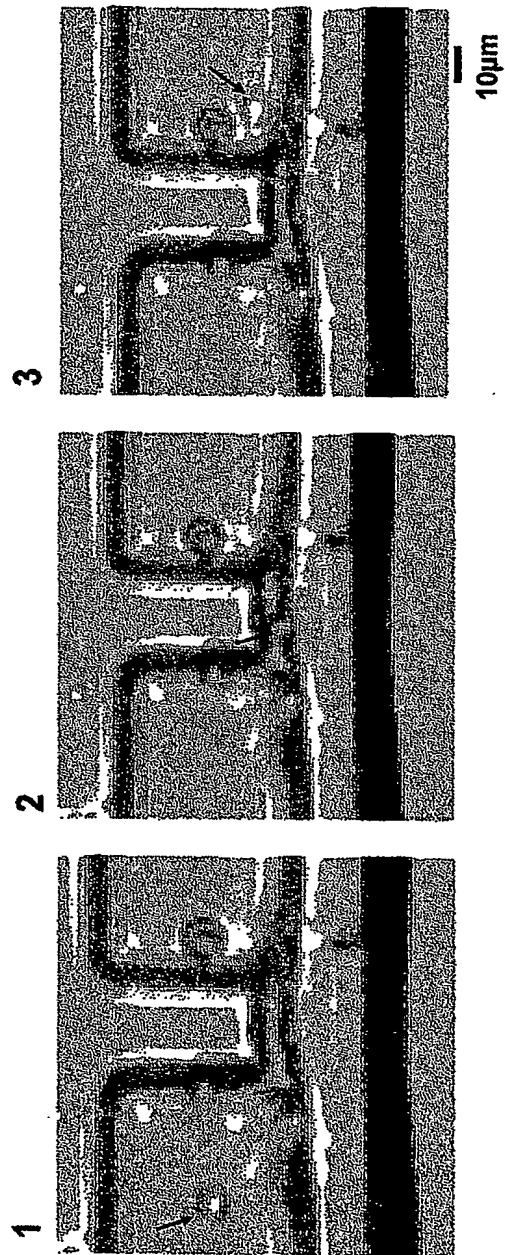
第 4 図



第 5 図



第 6 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006283

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12M1/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-88357 A (Effector Cell Institute, Inc.), 25 March, 2003 (25.03.03), Full text & EP 1340809 A1 & US 2003/3571 A1 & WO 2002/46355 A1	1-4
A	JP 2001-61464 A (Laboratory of Molecular Biophotonics), 13 March, 2001 (13.03.01), Full text (Family: none)	1-4
A	JP 10-191961 A (Liau, Ming-Yi), 28 July, 1998 (28.07.98), Full text & DE 19725602 A1	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 August, 2004 (04.08.04)Date of mailing of the international search report
17 August, 2004 (17.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006283

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-172956 A (Tokimec Inc.), 09 July, 1996 (09.07.96), Full text (Family: none)	1-4
A	JP 2002-153260 A (Japan Science and Technology Corp.), 28 May, 2002 (28.05.02), Full text & WO 2002/42411 A1 & EP 1344817 A1 & US 2004/67482 A1	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12M1/34

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12M1/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-88357 A (株式会社 エフェクター細胞研究所), 2003. 03. 25, 文献全体 & EP 1340809 A1 & US2003/3571 A1 & WO 2002/46355 A1	1-4
A	JP 2001-61464 A (株式会社分子バイオホトニクス研究所), 2001. 03. 13, 文献全体 (ファミリーなし)	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 08. 2004

国際調査報告の発送日

17. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
田中 耕一郎

4B 9636

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 10-191961 A (廖 明一) , 1998. 07. 28, 文献全体 &DE 19725602 A1	1-4
A	JP 8-172956 A (株式会社トキメック) , 1996. 07. 09, 文献全体 (ファミリーなし)	1-4
A	JP 2002-153260 A (科学技術振興事業団) , 2002. 05. 28, 文献全体 &WO 2002/42411 A1 &EP 1344817 A1 &US 2004/67482 A1	1-4